

УДК 547.992.2:57.02:543.42

DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-36-49

Для цитирования: Зыкова М.В., Трофимова Е.С., Кривошеков С.В., Лигачёва А.А., Данилец М.Г., Логвинова Л.А., Жолобова Г.А., Прищепова О.Ф., Юсубов М.С., Белоусов М.В. Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (1): 36–49

Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы

Зыкова М.В.¹, Трофимова Е.С.², Кривошеков С.В.^{1,3}, Лигачёва А.А.², Данилец М.Г.², Логвинова Л.А.¹, Жолобова Г.А.¹, Прищепова О.Ф.¹, Юсубов М.С.^{1,3}, Белоусов М.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга), Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

Цель работы – оценка возможности использования молекулярной спектроскопии (ИК-спектроскопии) как простого и информативного метода, позволяющего получить информацию о молекулярных соотношениях в структуре макромолекул ГК, а также сравнительный анализ их иммуотропной активности по способности влияния на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей *in vitro*.

Материал и методы. В работе использовали 18 различных ГК, полученных из девяти репрезентативных видов торфа из крупных торфяных месторождений Томской области. Гуминовые кислоты получали двумя способами – щелочной и пирофосфатной экстракцией. Молекулярные параметры структуры исследовали методом ИК-спектроскопии в таблетках с КВг. Биологическую активность ГК оценивали в культуре перитонеальных макрофагов, полученных из интактных мышей. В эксперименте использовали 100 мышей линии C57BL/6J обоего пола в возрасте 8–12 нед.

Результаты. Приведены кривые светопоглощения 18 различных ГК, установлены особенности и дана количественная оценка содержания различных структурных фрагментов на основании относительных интенсивностей полос поглощения. Исследована NO-стимулирующая активность ГК при культивировании с макрофагами мышей во взаимосвязи с молекулярными параметрами их структуры.

Заключение. Показано, что ГК верховых видов торфа характеризуются более высоким содержанием карбонильных, карбоксильных и сложноэфирных групп, а низинных – ароматического углерода, фенольных и спиртовых гидроксидов, простых эфирных и углеводных фрагментов. При этом ГК верховых видов торфа индуцируют активацию клеток путем усиления продукции NO, которая снижается при экстракции щелочью. Гуминовые кислоты низинных торфов независимо от способа выделения включают примесь липополисахарида (ЛПС). Некоторые ГК, полученные пирофосфатом натрия, обладают более высокой иммуотропной активностью, вызывая специфическую, независимую от примеси эндотоксина стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, торф, молекулярная спектроскопия, макрофаги, оксид азота.

✉ Зыкова Мария Владимировна, e-mail: gmv2@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс образования гуминовых веществ (ГВ) в биосфере является вторым по масштабности после фотосинтеза процессом трансформации органического вещества в природе [1]. Наиболее представительной в количественном отношении группой ГВ являются гуминовые кислоты (ГК). Гуминовые кислоты – это наиболее устойчивая форма органических соединений углерода вне живых организмов [1], они являются высокомолекулярными темноокрашенными соединениями полиморфной структуры с большим разнообразием функциональных групп и активных центров. Источниками ГК лекарственного значения чаще всего являются торф, сапрпель и мумие [2, 3]. На сегодняшний день ГК признаны одним из перспективных объектов «зеленой» химии как доступный и дешевый источник сырья для получения химически важных продуктов и лекарственных препаратов [4]. Препараты на основе ГК обладают широким спектром биологической активности (противовоспалительной, иммуностимулирующей, гепатопротекторной, антиоксидантной, антигипоксической и др.) [5], при этом в работах в большинстве случаев отсутствует этиологическая и химическая характеристика объекта исследования, что нивелирует результаты исследований. В то же время многочисленные литературные данные свидетельствуют, что биологические эффекты ГК напрямую зависят от их химической структуры и физико-химических свойств, обусловленных в первую очередь их этиологией и технологией получения [6–8]. В связи с этим важной задачей исследования таких сложных природных объектов, как высокомолекулярные соединения гуминовой природы (например, ГК торфа), является установление молекулярных параметров структуры, определяющих их фармакологическую активность, и выявление маркерных взаимосвязей для проведения корректной химической и биологической стандартизации.

Целью данного исследования является оценка возможности использования молекулярной спектроскопии (ИК-спектроскопии) как простого и информативного метода, позволяющего получить информацию о молекулярных соотношениях в структуре макромолекул ГК, и сравнительный анализ их иммунотропной активности по способности влияния на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования ГК отобраны девять репрезентативных видов торфа с крупных торфяных месторождений Томской области – олиготрофного болота Бакчарского болотного массива юго-восточных отрогов Большого Васюганского болота в междуречье р. Икса и Бакчар (образцы 1–4, 6, 7, 9) и эвтрофных болот «Клюквенное» и «Таган» (образцы 5 и 8 соответственно) (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Общая характеристика различных видов торфа Томской области			
Вид торфа, шифр образцов ГК	Степень разложе- ния, %	Золь- ность, %	Содержание ГК на органическую массу, %
Верховой сфагново- мочажинный, ГК-1	5–10	2,8	ГКщ-1 = 6,5
			ГКп-1 = 3,1
Верховой сосново- сфагново- пушицевый, ГК-2	30–35	7,2	ГКщ-2 = 31,4
			ГКп-2 = 13,2
Верховой магелланикум, ГК-3	10–15	2,7	ГКщ-3 = 16,9
			ГКп-3 = 4,2
Верховой фускум торф, ГК-4	5–10	2,6	ГКщ-4 = 13,3
			ГКп-4 = 3,9
Низинный древесный, ГК-5	25–30	8,9	ГКщ-5 = 38,2
			ГКп-5 = 26,0
Низинный травяно- моховый, ГК-6	35–40	4,5	ГКщ-6 = 21,5
			ГКп-6 = 6,8
Низинный травяной, ГК-7	40–45	16,3	ГКщ-7 = 37,3
			ГКп-7 = 17,4
Низинный древесный, ГК-8	30–35	6,4	ГКщ-8 = 38,6
			ГКп-8 = 17,9
Переходный осоко- вый, ГК-9	40–45	5,2	ГКщ-9 = 27,3
			ГКп-9 = 8,0

П р и м е ч а н и е. ГКп – торф, обработанный пирофосфатом натрия, ГКщ – торф, обработанный гидроксидом натрия.

Извлечение ГК проводили по следующей методике. Торф высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, измельчали и просеивали, обрабатывали раствором пирофосфата натрия (ГКп) или раствором гидроксида натрия (ГКщ) в течение 8 ч при постоянном перемешивании при температуре 50 °С, отделяли жидкую фазу от осадка фильтрованием. Для осаждения ГК из раствора жидкую фазу обрабатывали кислотой хлороводородной до pH = 1–2. Выпавшие в осадок ГК отделяли центрифугированием, отмывали до pH = 7 водой очищенной и высушивали при комнатной температуре. Содержание ГК в торфе определяли гравиметрически (ГФ XII).

Исследование молекулярных параметров структуры ГК проводили методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на ИК – Фурье-спектрометре ФСМ 1201 (ООО «Инфраспек», г. Санкт-Петербург)

в таблетках с KBr (в соотношении 1 : 100 соответственно), в интервале значений частоты 500–4000 см⁻¹. Среди аналитических методов неdestructивного спектроскопического анализа одним из наиболее информативных является ИК-спектроскопия [8–13]. Она дает информацию о наборе важнейших атомных групп и типов связей и позволяет решать задачу о соответствии полученных образцов ГК нативным веществам, входящим в состав торфа, в зависимости от их этиологии и способа получения [6–17].

Биологическую активность ГК оценивали в культуре перитонеальных макрофагов интактных мышей. В эксперименте использовали 100 мышей линии C57BL/6J обоего пола в возрасте 8–12 нед, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (первой конвенциональной категории согласно сертификату здоровья). Животные содержались в стандартных условиях вивария в неполной барьерной системе (температура 20–24 °С, относительная влажность (50 ± 20)%, вентиляция воздуха через НЕРА фильтр, воздухообмен 10–12 объемов помещения/час, световой режим 12 : 12 ч, уровень шума и освещенности не более 50–55 дБ и 250 Лк соответственно), получали *ad libitum* гранулированный корм (ГОСТ Р 50258-92) и стерилизованную водопроводную воду. Для получения макрофагов брюшную полость мышей линии C57BL/6J промывали ледяным изотоническим раствором хлорида натрия 0,9% (ООО «Завод Медсинтез», РФ). Затем суспензию клеток инкубировали 2 ч (в условиях 100%-й влажности и 5%-го СО₂) в пластиковых чашках Петри 2–2,5 × 10⁶/мл в культуральной среде (RPMI 1640 (Sigma, США), 10% ЭТС (HyClone, Великобритания), 20 мМ НЕPES (Sigma, США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 2 мМ L-глутамина (Sigma, США)). Затем собирали прилипшие к пластику клетки. Полученные макрофаги переносили в плоскодонные 96-луночные планшеты и культивировали (3,0 × 10⁶ клеток/мл) 48 ч в присутствии 10–100 мкг/мл ГК или 1 мкг/мл ЛПС (серотип O111:B4, Sigma, США). Продукцию оксида азота (NO) оценивали по содержанию нитритов в супернатантах клеток при помощи реактива Грейса [18], который смешивали с эквивалентным объемом надосадка с использованием многоканального спектрофотометра Titertek Multiskan[®] MCC (LabSystems, Финляндия) при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия.

Полученные в ходе исследования данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 6,0. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего арифметического (m), среднее арифметическое отклонение (σ). Проверку на нормальность распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Статистическую обработку проводили, используя метод однофакторного дисперсионного анализа и t-критерий Даннета для сравнения выборочных средних нескольких экспериментальных выборок с одной контрольной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Химические и биологические свойства ГК зависят не только от генезиса источника их получения (торф, сапрпель, уголь и др.), но и от способа выделения их из сырья [2, 11, 19]. Извлечение ГК из торфа водными растворами гидроксидов щелочных металлов представляет собой процесс образования солей, имеющих значительно большую степень ионизации в водных растворах, чем сами ГК. Среди всех известных экстрагентов ГК гидроокись натрия имеет наибольшую степень диссоциации в водных растворах, поэтому данный экстрагент обладает наибольшей извлекающей способностью, так как растворимость ГК усиливается повышением содержания гидроксильных ионов. Растворы пирофосфата натрия вследствие гидролиза также имеют щелочную реакцию, но при пирофосфатной экстракции происходит внутрисферное замещение лигандов в металло-гуминовых комплексах, поэтому вся специфичность действия пирофосфата натрия сводится к образованию нерастворимых осадков с кальцием и другими многовалентными катионами. Пирофосфат натрия за счет своих комплексообразующих свойств способен разрушать комплексы ковалентного и ионного типов. Пирофосфаты кальция, железа и алюминия труднорастворимы, поэтому параллельно протекает процесс декальцинирования, что способствует более полной экстракции именно свободных (истинных) ГК [2, 11, 19].

Полученные ГК торфа представляют собой аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха. Результаты извлечения ГК из торфа различными экстрагентами показали, что гидроксид натрия позволяет извлекать в 1,5–3 раза больше ГК, чем пирофосфат натрия.

Поглощение электромагнитного излучения в ИК-области характерно в первую очередь для органических компонентов торфа, обладающих

системами сопряженных связей в макромолекулах [9, 10]. Происхождение полос поглощения в ИК-диапазоне связано с колебаниями отдельных атомов или групп атомов, а также вращением их относительно σ -связей, поэтому такие спектры относятся к колебательно-вращательным, или молекулярным, спектрам, подчеркивая их отличие от спектров поглощения в видимой и УФ-областях, происхождение которых обусловлено электронными переходами [9, 10]. Спектры поглощения тепловой энергии в ИК-области характеризуют многие детали молекулярной структуры ГК, которые не могут быть выявлены в электронных спектрах [6–17, 20, 21]. Гуминовые кислоты селективно поглощают в ИК-области, поэтому их спектр состоит из набора специфических полос поглощения. По набору полос судят о качественном составе ГК, структуре молекулы, типах связей и атомных группировках, а по степени поглощения – о количестве вещества [7–10, 12, 13, 20]. Согласно литературным данным [2, 6–9, 11–17, 19–30], ГК различных каустобиолитов характеризуются спектрами сходного облика, по которым со значительной степенью надежности можно установить принадлежность изучаемых веществ к классу ГК, и используются как характерный диагностический признак. Наряду с общностью построения различных ГК как особого класса соединений, их ИК-спектры также позволяют выявить и некоторые особенности строения, обусловленные их генезисом и способом получения.

Анализ ИК-спектров (рис. 1, 2) исследуемых ГК свидетельствует о том, что для них характерны типичные для ГК полосы поглощения [2, 6–9, 11–17, 19–30]. Широкая интенсивная полоса поглощения с максимумом при $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями гидроксильных групп (ν_{OH}) алифатического и ароматического характера, преимущественно связанных водородными связями [7–9, 11, 13–16, 19, 20, 22–27, 29–31].

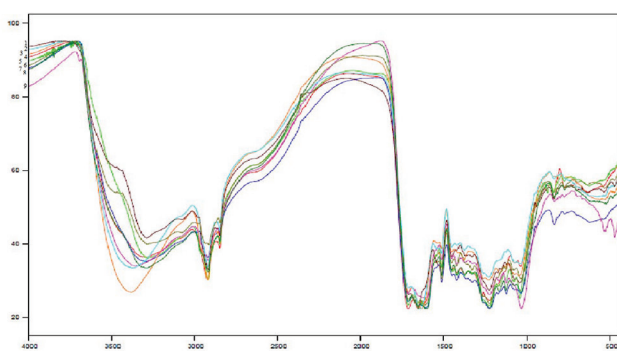


Рис. 1. Спектры ИК-поглощения щелочных гуминовых кислот

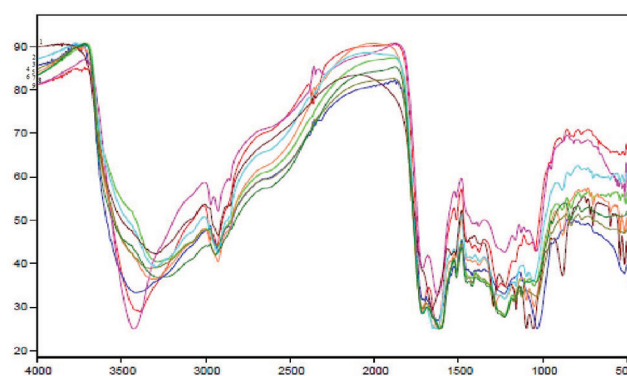


Рис. 2. Спектры ИК-поглощения пирофосфатных гуминовых кислот

Наличие этих же функциональных групп подтверждается наличием максимумов поглощения в интервале $1270\text{--}1220$ и $1170\text{--}1040\text{ см}^{-1}$ [2, 7–9, 11, 13–16, 19, 20, 22, 23, 25–27, 29–31]. Последнее обстоятельство подтверждается тем, что волновые числа уменьшаются до $3400\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ ($3421\text{--}3270\text{ см}^{-1}$) за счет понижения частоты колебаний при образовании водородных связей (для несвязанных свободных групп О–Н характерна интенсивность при $3650\text{--}3585\text{ см}^{-1}$) [24]. На длинноволновом крыле главной полосы около $3250\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ обнаруживается поглощение средней интенсивности, имеющее вид уступа (перегиба) и отвечающее колебаниям N–H (ν_{NH}) в структурах амида, аминов, связанных водородными связями [2, 7, 8, 11, 16, 24]. Плечо в интервале $3100\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ обусловлено колебаниями ароматических групп $=\text{C}\text{--}\text{H}$ [7, 8, 11, 24] в аренах с несколькими заместителями в кольце.

Полосы средней интенсивности хорошо видны при $2928\text{--}2921\text{ см}^{-1}$ и $2855\text{--}2842\text{ см}^{-1}$ за счет валентных колебаний групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$ боковых цепей в молекулах ГК [2, 7–9, 11, 13–16, 19, 20–27, 29–31], в том числе связанных с ароматическими фрагментами, судя по наличию полосы поглощения в области $(1385 \pm 10)\text{ см}^{-1}$ [7, 13, 24]. При этом наблюдаемые полосы вызваны преимущественно не концевыми метильными, а метиленовыми группировками, о чем свидетельствует почти идеальное совпадение волновых чисел со стандартными значениями (2926 и $(2853 \pm 10)\text{ см}^{-1}$) [11, 31]. На преобладание метиленовых групп указывает и характер полос в области $1480\text{--}1380\text{ см}^{-1}$ ($1447\text{--}1434\text{ см}^{-1}$) [2, 11, 14–16, 21, 22, 24, 26, 31], обнаруживаемые метиленовые группы не могут входить в состав сколько-нибудь длинных парафиновых цепей [14, 16, 26].

Данные цепи с группой $-(\text{CH}_2)_n$ при $n \geq 4$ должны давать сильную полосу поглощения в области $720\text{--}770\text{ см}^{-1}$, обусловленную маятниковыми

деформационными колебаниями группы $-\text{CH}_2-$ [14, 16, 26]. Невысокая интенсивность полос поглощения при $724\text{--}770\text{ см}^{-1}$ групп $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$ и наличие максимума в области $910\text{--}940\text{ см}^{-1}$ (полизамещенные алифатические цепи, пиранозные циклы) [2, 24, 26, 27], а также внеплоскостные колебания связи $=\text{C-H}$ в алкенах ($970\text{--}990\text{ см}^{-1}$) [30] согласуются с представлениями о малой роли алканов в построении ГК, а также с тем, что их алифатическая (гидролизуемая) часть состоит почти полностью из аминокислот и углеводов [2, 7, 11, 13, 19, 22, 29, 30].

Во всех ГК отмечается слабое поглощение при $2700\text{--}2400\text{ см}^{-1}$, присущее димерам карбоновых кислот [8, 14, 15, 23]. Эта широкая полоса считается очень характерной для валентных колебаний гидроксильных групп (ν_{OH}), участвующих в образовании сильных водородных связей в димерных формах карбоновых кислот за счет водородных связей между недиссоциированными карбоксильными группами или карбоксилат-анионами с водой [23]. Отчетливый максимум сильной интенсивности обнаруживается во всех спектрах в интервале $1725\text{--}1710\text{ см}^{-1}$. Эта полоса свойственна для валентных колебаний карбонильных групп ($\nu_{\text{C=O}}$), которая может быть представлена кетонами, альдегидами, карбоновыми кислотами и их функциональными производными [2, 7, 8, 11, 13–16, 19, 20, 22, 24, 27–31]. Считается, что данный максимум в большей степени обусловлен колебаниями оксо-группы в недиссоциированных карбоксильных группах карбоновых кислот, на что указывает также усиление интенсивности симметричных валентных колебаний карбоксилат-ионов в области $1400\text{--}1410\text{ см}^{-1}$ [11, 13, 14, 20, 23, 27, 28, 31], а сложных эфиров и кетонов — при 1770 см^{-1} (плечо) [14].

В ИК-спектрах всех образцов ГК обнаруживается сильная полоса в области $1650\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, обусловленная плоскостными валентными колебаниями сопряженных углерод-углеродных (ароматические, $\nu_{\text{C=C}}$) и углерод-кислородных связей (карбонилы, связанные водородными связями, карбоксилат-ионы, $\nu_{\text{C=O}}$), в ароматическом скелете и хинонах [2, 7, 8, 11, 13–16, 19, 20–31]. Считается [11, 24–27], что именно валентные колебания ароматических ($\nu_{\text{C=C}}$) связей ответственны за данную полосу, максимум которой приходится на 1610 см^{-1} . Полоса поглощения, отвечающая колебаниям оксо-группы в хинонах, связанных водородной связью, и (или) в карбоксильных группах, связанных с ароматическим кольцом, находится в области 1660 см^{-1} [7, 11, 25]. Во всех исследуемых образцах ГК максимум наблюдается также при

$1630\text{--}1650\text{ см}^{-1}$, что может быть обусловлено наложением полосы амидной группы (δ_{NH_2} , амид II) [7, 8, 11, 14, 15, 19, 22, 26, 29, 31] в структуре полипептидов и других азотсодержащих соединений. Полоса поглощения около 1513 см^{-1} ($\nu_{\text{C-C}}$) указывает на наличие неконденсированных моноароматических структур [11, 14, 15, 19, 20, 22, 24, 26]. В данной области наблюдаются также колебания связей полипептидов в составе ГК [2, 7, 8, 11, 13, 16, 29, 31], связанных с атомами азота и кислорода (N-H, N-C=O): первичной ($1580\text{--}1632\text{ см}^{-1}$) и вторичной ($1512\text{--}1560\text{ см}^{-1}$) аминокроупп.

Колебания в области $1264\text{--}1225\text{ см}^{-1}$ определяются в основном валентными ($\nu_{\text{C-O}}$) и деформационными колебаниями ($\delta_{\text{O-H}}$) связей недиссоциированных карбоновых кислот и их функциональных производных (в основном сложных эфиров как арильного, так и алкильного типов) [2, 7, 11, 13–15, 19, 20, 23, 26, 29, 31]. За поглощение излучения в коротковолновой части спектра в области $1175\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ ответственны валентные колебания гидроксильных групп (ν_{OH}) спиртов и углеводов [2, 7, 8, 11, 13–16, 19, 20, 22–24, 26, 27, 29, 31]. В интервале около $1075\text{--}1013\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) поглощают излучение первичные спирты, при $1125\text{--}1100\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) — вторичные спирты и при $1175\text{--}1150\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) — третичные спирты. Поглощения в данной области ($1175\text{--}1000\text{ см}^{-1}$) могут быть также обусловлены валентными колебаниями ($\nu_{\text{C-O-C}}$) гликозидных связей углеводов, лактонов, C-O-C-связями циклических и алифатических простых эфиров [2, 11, 13–15, 19, 22, 26, 27, 29]. В области волновых чисел $1000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ наблюдаются слабые полосы поглощения, возможно обусловленные внеплоскостными деформационными колебаниями ($\delta_{\text{C-H}}$) в ароматических кольцах, имеющих два и более незамещенных атомов водорода [7, 11, 15, 24], в том числе присутствием конденсированных многоядерных аренов ($755\text{--}760\text{ см}^{-1}$) [11, 15], а также деформационными колебаниями в области $625\text{--}600\text{ см}^{-1}$ терминальных алкинов ($\equiv\text{C-H}$) [11, 15].

Спектральные коэффициенты являются характерным диагностическим показателем структуры ГК. Высокая интенсивность полос поглощения свидетельствует о большем содержании функциональных групп [11, 13, 14, 16, 21, 22, 25, 27]. Для количественной оценки интенсивности полос поглощения и относительных концентраций функциональных групп в описании полиморфных и высокомолекулярных соединений используют методы базовых линий и относительных оптических плотностей [10, 13, 26], что дает важную информацию о природе, реакционной способно-

сти и структурной организации кислородсодержащих функциональных групп, вхождении белковых и углеводных компонентов, относительных пропорциях ароматических и алифатических фрагментов молекулы.

Относительная количественная оценка [10, 13, 26] содержания функциональных групп в молекулах ГК торфа по данным ИК-спектроскопии

дана на основании отношений оптических плотностей полос поглощения (ОППП) кислородсодержащих функциональных групп (ν_{OH} 3400 см^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ 1720 см^{-1} , $\nu_{\text{C-O, C-O-C}}$ 1225 см^{-1} , $\nu_{\text{C-O}}$ 1035 см^{-1}) к оптическим плотностям полос поглощения, соответствующим ароматическим (1610 см^{-1}) и алифатическим (2920 см^{-1}) фрагментам структуры, и представлена в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Отношение оптических плотностей полос поглощения к определенным длинам волн по данным ИК-спектроскопии*										
Шифр ГК	3400/ 1610	1720/ 1610	1225/ 1610	1035/ 1610	2920/ 1610	3400/ 2920	1720/ 2920	1225/ 2920	1035/ 2920	1035/ 1720/
ГКщ-1	0,62	0,89	0,85	0,79	0,77	0,81	1,15	1,09	1,02	0,89
ГКп-1	0,79	0,82	0,89	1,12	0,72	1,10	1,14	1,24	1,57	1,38
ГКщ-2	0,69	1,08	1,00	0,78	0,85	0,82	1,27	1,18	0,92	0,72
ГКп-2	0,96	0,96	0,89	0,81	0,80	1,19	1,20	1,12	1,02	0,85
ГКщ-3	0,75	0,88	0,82	0,76	0,77	1,01	1,14	1,06	0,98	0,86
ГКп-3	0,78	0,94	0,88	0,81	0,71	1,07	1,33	1,24	1,14	0,86
ГКщ-4	0,83	0,96	0,90	0,84	0,90	0,92	1,18	1,00	0,93	0,88
ГКп-4	0,84	0,94	0,90	0,93	0,79	1,06	1,06	1,14	1,17	0,99
ГКщ-5	0,71	0,95	0,97	0,85	0,72	0,99	1,32	1,35	1,19	0,90
ГКп-5	0,73	0,91	0,94	0,85	0,64	1,14	1,42	1,47	1,33	0,94
ГКщ-6	0,74	0,96	1,01	0,91	0,72	1,02	1,34	1,39	1,26	0,95
ГКп-6	0,83	0,86	0,84	1,06	0,64	1,29	1,33	1,30	1,64	1,22
ГКщ-7	0,92	0,95	0,95	1,01	0,79	1,16	1,20	1,19	1,23	1,07
ГКп-7	1,15	0,88	0,81	0,81	0,65	1,76	1,34	1,24	1,28	0,92
ГКщ-8	0,74	0,98	1,01	0,94	0,87	0,96	1,13	1,16	1,09	0,96
ГКп-8	0,83	0,91	0,93	0,76	0,65	1,14	1,41	1,44	1,17	0,83
ГКщ-9	0,73	0,98	0,98	0,85	0,83	0,87	1,17	1,18	1,13	0,96
ГКп-9	0,74	0,98	0,99	0,94	0,70	1,07	1,41	1,42	1,23	0,87

* отношения оптических плотностей полос поглощения рассчитаны исходя из средних значений.

Одними из основных кислородсодержащих функциональных групп в молекулах ГК торфа являются: гидроксильные (ν_{OH} 3400–3300 см^{-1} , $\nu_{\text{C-O}}$ 1150–1000 см^{-1}) группы, карбоксильные группы и их функциональные производные ($\nu_{\text{C=O}}$ 1725–1700 см^{-1} , $\nu_{\text{C-O}}$ 1260–1225 см^{-1}), а также простые эфирные группы ($\nu_{\text{C-O-C}}$ 1050–1035 см^{-1}). Рассматривая отношения ОППП алифатических фрагментов структуры к ароматическим ($A_{\text{alkil } 2920}/A_{\text{C=C } 1610}$), можно отметить, что во всех образцах ГК торфа наблюдается преобладание ароматических структур над алкильными. По данным литературы [14], снижение интенсивности поглощения при 2920 см^{-1} и 1100–1030 см^{-1} может указывать на более низкие молекулярные массы данных соединений. А также в большинстве случаев ароматические фрагменты преобладают над кислородсодержащими функциональными группами кроме некоторых образцов. В частности: 1) в ГКп-7 преобладают гидроксильные группы ($A_{\text{OH } 3400}/A_{\text{C=C } 1610} - 1,15$); б) в ГКщ-2 преобладают группы карбоновых кислот и сложных эфиров

($A_{\text{C=O } 1720}/A_{\text{C=C } 1610} - 1,08$ и $A_{\text{C-O } 1225}/A_{\text{C=C } 1610} - 1,00$). Повышение относительных значений спектральных коэффициентов $A_{\text{C=O } 1720}/A_{\text{C=C } 1610}$ может свидетельствовать об увеличении окисленности молекул, на этот факт также указывает самое низкое значение показателя $A_{\text{C-O-C } 1035}/A_{\text{C=O } 1720}$ (0,72), показывающего относительное содержание углеводных фрагментов [26]; в) в ГКщ-6 и ГКщ-8 преобладают группы сложных эфиров ($A_{\text{C-O } 1225}/A_{\text{C=C } 1610} - 1,01$ и 1,01 соответственно); г) в ГКп-1, ГКп-6 и ГКщ-7 преобладают простые эфирные группы ($A_{\text{C-O-C } 1225}/A_{\text{C=C } 1610} - 1,12$; 1,06 и 1,01 соответственно). Также наблюдается обратная зависимость в отношениях ОППП кислородсодержащих функциональных групп к алифатическим фрагментам структуры, где в основном преобладают группы карбоновых кислот и сложных эфиров, наименьшее содержание отмечено для гидроксильных и простых эфирных групп щелочных ГК верховых видов торфа.

Сравнивая между собой различные отношения ОППП в ГК, полученные методами щелочной и

пирофосфатной экстракций верховых видов торфа, можно отметить некоторые особенности. Так, ГК-3 и ГК-9 имеют некоторое сходство в распределении основных конституционных фрагментов. В пирофосфатных ГК наблюдается преобладание ароматических фрагментов над алифатическими, а также большее содержание всех кислородсодержащих групп, очень низкие значения относительного содержания углеводных фрагментов по сравнению с щелочными ГК. При этом как в ГКп-9, так и ГКщ-9 отмечается большее содержание групп карбоновых кислот, простых и сложных эфиров при практически одинаковом содержании гидроксильных групп в сравнении с ГК-3. Это может свидетельствовать о большей кислотности и меньшей замещенности функциональных групп в ГК-3, что также подтверждается одинаково низким содержанием углеводных фрагментов (0,86) как в ГКп-3, так и ГКщ-3.

Аналогичные тенденции идентичного распределения элементов структуры в молекулах отмечены еще для двух образцов – ГК-1 и ГК-4. В щелочных ГК наблюдается преобладание групп карбоновых кислот, в пирофосфатных ГК – преобладание ароматических фрагментов, гидроксильных, простых и сложноэфирных групп, углеводных фрагментов. При этом щелочные и пирофосфатные ГК-4 содержат больше гидроксильных, карбоксильных и сложноэфирных групп, а ГК-1 – простых эфирных групп. Последнее может свидетельствовать о большей замещенности функциональных групп и меньшей кислотности ГК-1 как и самое высокое содержание углеводных фрагментов в ГКп-1 (1,38). Верховой сосново-пушицевый торф (ГК-2) отличается от остальных образцов тем, что в ГКщ-2 преобладают группы карбоновых кислот и сложных эфиров ($A_{C=O\ 1720}$ и $A_{C-O\ 1225}$) в сравнении с ГКп-2, и отмечено самое низкое содержание углеводных фрагментов среди всех ГК (0,72). При этом ГКп-2 также имеет очень низкое содержание углеводной части (0,85) при достаточной высоком спектральном коэффициенте $A_{C=O\ 1720}/A_{C=C\ 1610}$ (0,96), что свидетельствует об увеличении окисленности молекулы.

Сравнивая между собой значения спектральных коэффициентов различных показателей отношений ОППП в щелочных и пирофосфатных ГК низинных видов торфа, также можно отметить некоторые особенности. Образец ГК-6 по распределению основных фрагментов структуры сходен с ГК-2, в котором как и в щелочных ГК преобладают группы карбоновых кислот и сложных эфиров ($A_{C=O\ 1720}$ и $A_{C-O\ 1225}$). В пирофосфатных ГК – гидроксильные и простые эфирные группы,

ароматические фрагменты, но отличаются их большим содержанием. Отличительной особенностью ГК-6 от ГК-2 выступает относительно высокое содержание углеводных фрагментов (ГКп-6 – 1,22 и ГКщ-6 – 0,95; ГКп-2 – 0,85 и ГКщ-2 – 0,72). Оставшиеся три образца ГК низинного торфа – ГК-5, ГК-7 и ГК-8 – идентичны между собой. В молекулах их щелочных ГК преобладает доля групп карбоновых кислот, сложных и простых эфиров относительно ароматических структур, а в пирофосфатных ГК – доля ароматического углерода, гидроксильных групп (фенольных и спиртовых), а также остальных кислородсодержащих групп относительно алифатических фрагментов структуры. Скорее всего, это может быть связано с высоким содержанием углеводных остатков (гликозидов), а также, что число кислородсодержащих групп всех типов выше числа алифатических С-Н-связей для ГК этих видов торфа. Можно отметить, что все образцы ГК-7 отличаются от остальных образцов наибольшим содержанием фенольных и спиртовых гидроксильных групп (ГКщ-7: $A_{OH\ 3400}/A_{C=C\ 1610} - 0,9178$ и $A_{OH\ 3400}/A_{alkil\ 2920} - 1,1572$; ГКп-7: $A_{OH\ 3400}/A_{C=C\ 1610} - 1,1540$ и $A_{OH\ 3400}/A_{alkil\ 2920} - 1,7623$), к тому же ГКщ-7 среди всех остальных низинных видов торфа содержат самое высокое количество углеводных фрагментов ($A_{C-O-C\ 1035}/A_{C=O\ 1720} - 1,22$). Все образцы ГК-5, наоборот, отличаются самым низким содержанием фенольных и спиртовых гидроксильных групп (ГКщ-5: $A_{C=C\ 1610} - 0,7099$ и $A_{OH\ 3400}/A_{alkil\ 2920} - 0,9861$; ГКп-5: $A_{OH\ 3400}/A_{C=C\ 1610} - 0,7311$ и $A_{OH\ 3400}/A_{alkil\ 2920} - 1,1401$). Также ГКп-5 имеют самые высокие показатели содержания карбоксильных и сложноэфирных групп, ароматических структур, а ГКщ-5, наоборот, самым меньшим содержанием ароматических структур. Противоположная зависимость отмечена для ГК-8, где более ароматичными среди всех образцов являются щелочные ГК, а менее – пирофосфатные. Все образцы ГК-6 имеют самые высокие показатели содержания простых эфирных групп. Наибольшее количество углеводных фрагментов отмечено для ГКп-1, ГКп-6 и ГКщ-7.

Предварительно было показано [32], что ГК способны дозозависимо усиливать продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами (МФ) мышей. При изучении NO-активирующих свойств ГК (табл. 3) отмечено, что ЛПС – стандартный активатор МФ (контроль 1) – вызывал усиление продукции оксида азота клетками в 14 и 35 раз.

Инкубация МФ с ЛПС, обработанным полимиксином В, приводила к значительному снижению концентрации нитритов в супернатанте на 65 и 43% соответственно сериям эксперимента.

Т а б л и ц а 3

Влияние гуминовых кислот на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6, X ± t			
Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	
		инкубация без полимиксина В (контроль 2)	инкубация с полимиксином В
Среда	–	1,08 ± 0,04	1,10 ± 0,08
ЛПС (контроль 1)	1	38,40 ± 0,62*	21,91 ± 0,41*□
ГКщ-1	50	28,33 ± 0,77*·↓	7,27 ± 0,16*□▲
ГКп-1	10	33,75 ± 0,95*·	38,90 ± 1,32*□▲
ГКщ-3	50	6,20 ± 0,59*·↓	3,07 ± 0,30*□▲
ГКп-3	10	39,10 ± 0,70*·	32,67 ± 0,16*□▲
ГКщ-4	100	9,87 ± 0,76*·↓	4,33 ± 0,65*□▲
ГКп-4	10	34,68 ± 0,50*·	38,60 ± 0,13*□▲
ГКщ-5	50	28,99 ± 0,66*·↓	5,82 ± 0,20*□▲
ГКп-5	10	42,05 ± 0,57*·	33,23 ± 0,27*□▲
ГКщ-6	100	29,76 ± 0,39*·	7,77 ± 0,10*□▲
ГКп-6	10	33,16 ± 0,81*·	29,27 ± 0,49*□▲
Среда	–	1,56 ± 0,02	1,28 ± 0,10
ЛПС (контроль 1)	1	22,08 ± 2,77*	7,74 ± 0,28*□
ГКщ-2	50	5,51 ± 0,74*·↓	3,37 ± 0,12*□▲
ГКп-2	100	10,00 ± 0,95*·	13,77 ± 0,20*□▲
ГКщ-7	10	29,97 ± 0,50*·	12,82 ± 0,33*□▲
ГКп-7	50	31,87 ± 0,53*·	19,26 ± 0,37*□▲
ГКщ-8	50	5,18 ± 0,61*·↓	3,02 ± 0,10*□▲
ГКп-8	50	29,81 ± 1,12*·	13,20 ± 0,30*□▲
ГКщ-9	50	2,97 ± 0,09*·↓	2,02 ± 0,07*□▲
ГКп-9	50	31,22 ± 0,67*·	3,08 ± 0,09*□▲

П р и м е ч а н и е: · – различия показателя по сравнению с инкубацией с ЛПС (контроль 1) без полимиксина В достоверны, $p < 0,05$; ↓ – различия NO-стимулирующей активности ГКп по сравнению с ГКщ; □ – различия показателя по сравнению с инкубацией МФ с действующими веществами (контроль 2) без полимиксина В достоверны, $p < 0,05$; ▲ – различия показателя по сравнению с инкубацией МФ с ЛПС (контроль 1) в присутствии полимиксина В достоверны, $p < 0,05$; $n = 5$.

* различия показателя со средой достоверны.

Инкубирование клеток с щелочными ГК (контроль 2) из всех видов торфа приводило к увеличению показателя относительно интактного контроля. Наибольшие значения стимуляции в 27 раз выявлены у образцов ГКщ-5 (50 мкг/мл) и ГКщ-6 (100 мкг/мл), в 26 и 19 раз – ГКщ-1 (50 мкг/мл) и ГКщ-7 (50 мкг/мл) и в 9 раз – ГКщ-3 (100 мкг/мл). Инкубация с образцами ГКщ-2 (50 мкг/мл), ГКщ-4 (10 мкг/мл), ГКщ-8 (концентрация 50 мкг/мл) и ГКщ-9 (50 мкг/мл) приводила к увеличению концентрации оксида азота в культуре МФ в 3,5; 5,7; 3,3 и 1,9 раз соответственно. При этом необходимо отметить, что активирующее действие ГКщ-7, ГКщ-8 и ГКщ-9 было в 1,3–1,4 раза выше значения ЛПС-стимулированного контроля. Культивирование клеток с пирофосфатными образцами ГКп-1, ГКп-3, ГКп-4, ГКп-5 и ГКп-6 в концентрации 10 мкг/мл усиливало синтез нитритов МФ в 30 и более раз, ГКп-7, ГКп-8 и ГКп-9 (50 мкг/мл) – в 19–20 раз и ГКп-2 (100 мкг/мл) 9 раз. Активация продукции NO образцами ГКп-1, ГКп-2, ГКп-3 и ГКп-6 относительно ЛПС-стимулированного контроля была ниже в 1,2–2 раза, а образцами ГКп-4, ГКп-5, ГКп-7, ГКп-8 и ГКп-9 превышала этот показатель в 1,4–1,8 раза.

Известно, что вещества растительного происхождения, в том числе и ГК, могут содержать

примесь эндотоксина, который также вызывает усиление продукции оксида азота [33]. Под эндотоксинами понимают бактериальные токсические вещества, например структурные компоненты мембран грам-негативных бактерий – липополисахариды. Степень очистки изучаемых веществ от ЛПС оценивали в экспериментах с использованием полимиксина В, который связывается непосредственно с эндотоксином и таким образом блокирует его стимулирующее действие на макрофаги. После инкубации щелочных ГК с полимиксином В было обнаружено, что их активность снижалась на 32–80%, из чего следует, что все они содержали примесь эндотоксина. У восьми из девяти проб показатель был в 2,5–7 раз ниже аналогично обработанного ЛПС-стимулированного контроля, только образец ГКщ-7 превышал показатель в 1,6 раза. Добавление ингибитора ЛПС в культуру клеток с пирофосфатными ГК выявило, что стимулирующие свойства трех образцов верховых видов торфа ГКп-1, ГКп-2 и ГКп-3 не зависели от примеси эндотоксина и более того усиливались на 15%, 11 и 37%. Образцы ГКп-4, ГКп-5, ГКп-6 снижали NO-продуцирующую активность МФ относительно контроля 2 на 17%, 21, 12%, что свидетельствует о слабой степени засорения

образцов. Наиболее выраженное снижение концентрации нитритов на 40%, 56 и 90% было выявлено в супернатанте клеток, обработанных образцами низинного и переходного торфа ГКп-7, ГКп-8 и ГКп-9. Но, несмотря на выявленное снижение активности, восемь из девяти образцов в 1,3–4,2 раза превышали продукцию оксида азота по сравнению с обработанным ингибитором ЛПС-стимулированным контролем, за исключением ГКп-9, добавление полимиксина В к которому снижало показатель в 2,5 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование различных экстрагентов для выделения ГК из торфа (натрия гидроксида и натрия пирогосфата) позволяет получить разное содержание ГК из одного и того же объекта (конкретного вида торфа) с разницей в 1,5–3 раза, при этом еще и отличающееся по своим химическим и биологическим свойствам. Анализ молекулярных спектров всех исследуемых образцов ГК свидетельствует о том, что они имеют однотипный характер в ИК-области спектра, что говорит об однотипности данных соединений [6–17, 19–30]. Все образцы ГК независимо от их этиологии и способа получения имеют родственное строение, поскольку показатель оптической плотности в молекулярной спектроскопии связан с определенным характером строения макромолекул ГК, что позволяет оценить их специфические интегральные параметры. Максимальная интенсивность полос поглощения в спектрах всех исследуемых ГК отмечена для гидроксильных (спирты, фенолы, углеводы), карбонильных (хиноны и гидроксихиноны), карбоксильных групп и их функциональных производных (сложные эфиры, лактоны, амиды), простых эфирных и гликозидных групп, алифатических и ароматических фрагментов. Анализируя данные ОППП, можно сделать заключение о дифференциальных молекулярных параметрах различных исследуемых ГК, в частности: пирогосфатные ГК всех верховых видов торфа отличаются от щелочных большим вкладом ароматических структур в формирование их молекул, особенно ГКп-3 и ГКп-9, а также преобладанием кислородсодержащих функциональных групп. Причем наибольшее содержание гидроксильных групп отмечено для ГКп-2 и ГКп-4, карбоксильных и сложноэфирных групп – для ГКп-9, для ГКп-1 – самое высокое содержание углеводных фрагментов. Среди щелочных ГК верховых видов торфа наибольшее содержание гидроксильных и

карбоксильных групп отмечено для ГКщ-4, наибольшее содержание алкоксидных групп показано для ГКщ-1. Пирогосфатные ГК всех низинных видов торфа являются более ароматичными и содержат больше гидроксильных (фенольных и спиртовых) групп, а также углеводных остатков (гликозидов), а щелочные ГК – больше остальных кислородсодержащих групп (карбониллов, карбоксиллов, сложных и простых эфиров). Отмечено, что ГК всех низинных видов торфа содержат больше ароматических структур, более богаты фенольными и спиртовыми группами, углеводными остатками и простыми эфирами, а ГК верховых видов торфа имеют более высокое содержание карбонильных, карбоксильных и сложноэфирных групп.

Анализ результатов NO-активирующего действия ГК показал, что семь из девяти пирогосфатных образцов ГК по активности были достоверно выше образцов щелочных ГК: ГКп-1 – в 1,2; ГКп-2 – 1,8; ГКп-3 – 3,5; ГКп-4 – 6,3; ГКп-5 – 1,5; ГКп-8 – 5,7 и ГКп-9 – в 10,5 раза, а двух – ГКп-6 и ГКп-7 не отличались от таковых у щелочных. Необходимо также отметить, что используемые концентрации пирогосфатных образцов ГК были в 5–10 раз ниже щелочных образцов ГК. Это играет значительную роль в спектрофотометрическом определении показателя оптической плотности при определении концентрации нитритов в супернатантах клеток, поскольку использование высоких концентраций исследуемых веществ, окрашенных в природный темный цвет, способно приводить к искажению результатов исследования [32]. Судя по наличию примеси эндотоксина в различных образцах ГК, можно отметить, что щелочной способ выделения ГК из торфов различного генеза, несмотря на значительно высокий выход активных веществ, приводит к загрязнению исследуемых образцов бактериальными примесями. В результате ГК, выделенные пирогосфатным способом, обладают значительным преимуществом при активации макрофагов, вызывая специфическое, независимое от примеси эндотоксина усиление ими продукции оксида азота, что весьма важно для субстанций природного происхождения и перспективно для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методом ИК-спектроскопии для 18 исследуемых образцов ГК установлены характерные интегральные и дифференциальные молекулярные параметры в зависимости от их этиологии и способа получения.

2. Все исследуемые образцы ГК проявляют в эксперименте иммуностропное действие, достоверно повышая активность NO-синтазы.

3. Образцы ГК верховых видов торфа достоверно индуцируют активацию клеток путем усиления продукции оксида азота, которая значительно повышается при использовании в качестве экстрагента ГК натрия пиррофосфата.

4. Пиррофосфатные образцы ГК верховых видов торфа ГКп-1, ГКп-2 и ГКп-3, отличающиеся большей ароматичностью и более высоким содержанием кислородсодержащих функциональных групп, по сравнению с образцами, полученными щелочной экстракцией, обладают более высоким NO-активирующим действием, вызывая специфическую, независимую от примеси эндотоксина (ЛПС) стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе каждого автора. Зыкова М.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Трофимова Е.С. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Кривошеков С.В. – анализ и интерпретация данных. Лигачёва А.А. – анализ и интерпретация данных. Данилец М.Г. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Логвинова Л.А. – анализ и интерпретация данных. Жолобова Г.А. – анализ и интерпретация данных. Прищепова О.Ф. – анализ и интерпретация данных Юсубов М.С. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Белоусов М.В. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения

работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований.

Исследования с использованием лабораторных мышей одобрены комиссией по гуманному отношению к животным НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 98122015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере // Саровский образовательный журнал. 1997; 2: 56–63.
2. Schepetkin I.A.[et al.] Characterization and Biological Activities of Humic Substances from Mumie // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 5: 5245–5254.
3. Senesi N., Miano T.M. Humic Substances in the Global Environment and Implications for Human Health. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1994; 927.
4. Валуев А.И., Валуева Т.А., Валуев И.А., Платэ Н.А. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений // *Успехи биологической химии*. 2003; 43: 307–328.
5. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и перспектив применения гуминовых веществ в медицине // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010; 73(9): 43–48.
6. Chen J.C., LeBoeuf E.J., Choa S., Gua B. Spectroscopic Characterization of Structural and Functional Properties of Natural Organic Matter Fractions // *Chemosphere*. 2002; 48: 59–68.
7. Mengchang H.E., Yehong SHI, Chunye LIN Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China // *Journal of Environmental Sciences*. 2008; 20: 1294–1299.
8. Stevenson F.J. Humus Chemistry: genesis, composition, reactions. New York: Wiley&Sons, 1994: 496.
9. Караванова И.В. Оптические свойства почв. М.: Наука, 2003: 185.
10. Купцов А.Х., Жижин Г.Н. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М.: Мир, 2001: 656.
11. Орлов Д.С., Осипова Н.Н. Инфракрасные спектры почв и почвенных компонентов. М.: МГУ, 1988: 89.
12. Sharma Y.R. Elementary Organic Spectroscopy / New Delhi: S. Chand&Company Ltd, 1999; 65.
13. Zaccone C., Miano T.M., Shotyk W. Qualitative comparison between raw peat and related humic acids in an ombrotrophic bog profile // *Organic Geochemistry*. 2007; 38: 151–160. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2006.06.023.
14. Лиштван И.И. [и др.] Спектральные исследования фракций гуминовых кислот // *Химия твердого топлива*. 2006; 4: 3–11.
15. Лиштван И.И. [и др.] Трансформация систем полисопряжения гуминовых кислот в процессе метаморфизма каустобиолитов // *Химия твердого топлива*. 2012; 3: 14.
16. Патраков Ю.Ф., Счастливцев Е.А., Мандаров Г.А. Изучение бурогоугольных гуминовых и фульвокислот ме-

- тодом ИК-спектроскопии // *Химия твердого топлива*. 2010; 5: 9–14.
17. Stenberg B. [et al.] Visible and near infrared spectroscopy in soil science // *Advances in Agronomy*. 2010; 107: 163–215. DOI:org/10.1016/S0065-2113(10)07005-7.
18. Belska N.V. [et al.] Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response // *International Immunopharmacology*. 2010; 10 (8): 933–942. DOI:10.1016/j.intimp.2010.05.005.
19. Марыганова В.В., Бамбалов Н.Н., Парамон С.В. Воздействие вида экстрагента на структуру извлекаемых из торфа гуминовых кислот // *Химия твердого топлива*. 2003; 1: 3–10.
20. Kiprop A.K. [et al.] Synthesis of Humic and Fulvic Acids and their Characterization using Optical Spectroscopy (ATR-FTIR and UV-Visible) // *International Journal of Applied Science and Technology*. 2013; 3 (8): 28–35.
21. Shin H.S., Monsallier J.M., Choppin G. R. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid // *Talanta*. 1999; 50: 641–647.
22. Наумова Г.Н., Стригуцкий В.П., Жмакова Н.А., Овчинникова Т.Ф. Связь молекулярной структуры гуминовых кислот и их биологической активности // *Химия твердого топлива*. 2001; 2: 3–3.
23. Ненаходов Д.В. [и др.] Определение состава препаратов гуминовых кислот различной чистоты методами спектроскопии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009; 9(5): 665–670.
24. Новикова Л.Н. [и др.] Состав гуминовых веществ окисленного бурого угля Монголии // *Химия твердого топлива*. 2010; 2: 14–24.
25. Сивакова Л.Г., Лесникова Н.П., Ким Н.М., Ротова Г.М. Физико-химические свойства гуминовых веществ торфа и бурого угля // *Химия твердого топлива*. 2011; 1: 3–8.
26. Юдина Н.В. Тихова В.И. Структурные особенности гуминовых кислот торфов, выделенных разными способами // *Химия растительного сырья*. 2003; 1: 93–96.
27. Ellerbrock R.H., Höhn A., Gerke H.H. Characterization of soil organic matter from a sandy soil in relation to management practice using FT-IR spectroscopy // *Plant and Soil*. 1999; 213: 55–61.
28. Gondar D. [et al.] Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog // *Geoderma*. 2005; 126(3–4): 367–374.
29. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles // *Peat and Mires*. 2009; 4: 175–197.
30. Li L. [et al.] Characterization of humic acids by ultrafiltration // *Organic Geochemistry*. 2004; 35: 1025–1037.
31. Fernandes A. [et al.] Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances // *Journal of Molecular Structure*. 2010; 971 (1): 33–38. DOI: 10.1016/j.molstruc.2010.02.069
32. Трофимова Е.С. [и др.] Влияние гуминовых кислот торфа различного генеза на продукцию оксида азота *in vitro* (скрининговое исследование) // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 5: 629–636.
33. Schepetkin I.A., Quinn M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential // *International Immunopharmacol.* 2006; 6 (3): 317–333.

Поступила в редакцию 22.11.2016

Утверждена к печати 19.12.2016

Зыкова Мария Владимировна, канд. фарм. наук, доцент кафедры химии, СибГМУ, г. Томск.

Трофимова Евгения Сергеевна, канд. мед. наук, ст. научный сотрудник отдела иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Кривошеков Сергей Владимирович, мл. научный сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Лигачёва Анастасия Александровна, научный сотрудник отдела иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Данилец Марина Григорьевна, д-р биол. наук, гл. научный сотрудник отдела экспериментальных биологических моделей, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Логвинова Людмила Анатольевна, аспирант кафедры фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

Жолобова Галина Александровна, канд. хим. наук, доцент кафедры химии г. Томск.

Прищепова Ольга Федоровна, ст. преподаватель кафедры химии, СибГМУ, г. Томск.

Юсубов Мехман Сулейманович, д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск; гл. научный сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

✉ Зыкова Мария Владимировна, e-mail: gmvt2@rambler.ru

УДК 547.992.2:57.02:543.42

DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-36-49

For citation: Zykova M.V., Trofimova E.S., Krivoshchekov S.V., Ligacheva A.A., Danilets M.G., Logvinova L.A., Zholobova G.A., Prishchepova O.F., Yusubov M.S., Belousov M.V. Spectral parameters and biological activity of macromolecular compounds of humic etiology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (1): 36–49

Spectral parameters and biological activity of macromolecular compounds of humic etiology

Zykova M.V.¹, Trofimova E.S.², Krivoshchekov S.V.^{1,3}, Ligacheva A.A.², Danilets M.G.², Logvinova L.A.¹, Zholobova G.A.¹, Prishchepova O.F.¹, Yusubov M.S.^{1,3}, Belousov M.V.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moskov Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS)

3, Lenina Str., Tomsk, 634028, Russian Federation

³ National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)

30, Lenina Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Materials and methods. 18 native humic acids (HAs) were received from nine representative types of peat of the Tomsk region. Two extraction methods were used: sodium hydroxide and sodium pyrophosphate. Molecular structure parameters were investigated by IR-spectroscopy. The assessment of qualitative and quantitative features of the IR-spectra of 18 different humic acids was made. When HAs with mouse macrophages were cultured their ability to influence the NO-stimulation was determined. Thus, the biological activity of HAs and its dependence on the parameters of the molecular structure were studied.

Results. The results of infrared spectroscopy showed that the HAs of upland types of peat contain more carbonyl, carboxyl, and ester groups, and HAs of lowland types of peat contain more aromatic carbon, phenolic and alcoholic hydroxyl, ether and carbohydrate fragments. The results of biological activity showed that HAs from upland types of peat induce the formation of nitrogen oxide, wherein the cell activation decreases with HAs obtained by alkali. All types of HAs from lowland types of peat contain an admixture of endotoxin. Some HAs obtained by sodium pyrophosphate have higher immunotropic activity; the HAs can cause antigen-specific stimulation of cells. The activity of HAs does not depend on endotoxin admixture. The results of molecular spectroscopy showed that the most biologically active HAs have higher aromaticity and higher concentration of oxygen-containing functional groups. This result can be used as a marker factor in the standardization of HAs.

Key words: humic acids, peat, molecular spectroscopy, macrophages, nitric oxide.

REFERENCES

- Orlov D.S. Guminovye veshchestva v biosfere [Humic substances in the biosphere] // *Sorovskiy obrazovatel'nyy zhurnal - Sarov educational journal*. 1997; 2: 56–63 (in Russian).
- Schepetkin I.A.[et al.] Characterization and Biological Activities of Humic Substances from Mumie // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 5: 5245–5254.
- Senesi N., Miano T.M. Humic Substances in the Global Environment and Implications for Human Health. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1994; 927.
- Valuev L.I., Valueva T.A., Valuev I.L., Plate N.A. Polimernye sistemy dlya kontroliruemogo vydeleniya biologicheski aktivnykh soedineniy [The polymeric controlled release systems for bioactive compounds] // *Uspekhi Biologicheskoi Khimii - Special issue. Biological chemistry reviews*. 2003; 43: 307–328 (in Russian).
- Buzlama A.V., Chernov U.N. Analiz farmakologicheskikh svoystv, mekhanizmov deystviya i perspektiv primeneniya guminovykh veshchestv v meditsine [Humic substances: Pharmacological properties, mechanisms of action, and prospects for use in medicine] // *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya - Experimental and Clinical Pharmacology*. 2010; 73 (9): 43–48 (in Russian).
- Chen J.C., LeBoeuf E.J., Choia S., Gua B. Spectroscopic Characterization of Structural and Functional Properties

- of Natural Organic Matter Fractions // *Chemosphere*. 2002; 48: 59–68.
7. Mengchang H.E., Yehong SHI, Chunye LIN Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China // *Journal of Environmental Sciences*. 2008; 20: 1294–1299.
 8. Stevenson F.J. Humus Chemistry: genesis, composition, reactions. New York: Wiley&Sons, 1994: 496.
 9. Karavanova I.V. Opticheskie svoystva pochvy [The optical properties of the soil]. M.: Nauka, 2003: 185 (in Russian).
 10. Kuptsov A.Kh., Zhizhin G.N. Infrakrasnye spektry i stroenie organicheskikh soedineniy [Infrared spectra and structure of organic compounds]. M.: Mir, 2001: 656 (in Russian).
 11. Orlov D.S., Osipova N.N. Infrakrasnye spektry pochvy i pochvennykh komponentov [Infrared spectra of soils and soil components]. M.: MGU, 1988: 89 (in Russian).
 12. Sharma Y.R. Elementary Organic Spectroscopy / New Delhi: S. Chand&Company Ltd, 1999; 65.
 13. Zaccone C., Miano T.M., Shotykh W. Qualitative comparison between raw peat and related humic acids in an ombrotrophic bog profile // *Organic Geochemistry*. 2007; 38: 151-160. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2006.06.023.
 14. Lishtvan I.I. [et al.] Spektral'nye issledovaniya fraktsiy guminovykh kislot [Spectral investigation of fractions of humic acid] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2006; 4: 3–11 (in Russian).
 15. Lishtvan I.I. [et al.] Transformatsiya sistem polisopryazheniya guminovykh kislot v protsesse metamorfizma kaustobiolitov [Transformation of the polyconjugation systems of humic acids in the course of the metamorphism of caustobioliths] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2012; 3: 14–19 (in Russian).
 16. Patrakov Y.F., Schastlivtsev E.L., Mandrov G.A. Izucheniye burougol'nykh guminovykh i ful'vokislot metodom IK-spektroskopii [Characterization of brown coal humic and fulvic acids by IR spectroscopy] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2010; 5: 9–14 (in Russian).
 17. Stenberg B. [et al.] Visible and near infrared spectroscopy in soil science // *Advances in Agronomy*. 2010; 107: 163-215. DOI: org/10.1016/S0065-2113(10)07005-7.
 18. Belska N.V., Guriev A.M., Danilets M.G. et al. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response // *International Immunopharmacology*. 2010; 10 (8): 933–942. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.05.005.
 19. Maryganova V.V., Bambalov N.N., Parmon S.V. Vozdeystvie vida ekstragenta na strukturu izvlekaemykh iz torfa guminovykh kislot [The effect of the extractant type on the structure of humic acids extracted from peat] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2003; 1: 3–10 (in Russian).
 20. Kiprova A.K. [et al.] Synthesis of Humic and Fulvic Acids and their Characterization using Optical Spectroscopy (ATR-FTIR and UV-Visible) // *International Journal of Applied Science and Technology*. 2013; 3 (8): 28–35.
 21. Shin H.S., Monsallier J.M., Choppin G. R. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid // *Talanta*. 1999; 50: 641–647.
 22. Naumova G.V., Striguckij V.P., Zhmakova N.A., Ovchinnikova T.F. Svyaz' molekulyarnoy struktury guminovykh kislot i ikh biologicheskoy aktivnosti [The relation between the molecular structure of humic acids and their biological activity] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2001; 2: 3–13 (in Russian).
 23. Nenakhov D.V. [et al.] Opredelenie sostava preparatov guminovykh kislot razlichnoy chistoty metodami spektroskopii [Determination of the composition of preparations of humic acids of different purity spectroscopy methods] // *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy – Sorption and chromatography processes*. 2009; 9(5): 665–670 (in Russian).
 24. Novicova L.N. [et al.] Sostav guminovykh veshchestv oksislennogo burogo uglya Mongolii [Composition of humic substances in oxidized brown coal from Mongolia] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2010; 2: 14–24 (in Russian).
 25. Sivakova L.G., Lesnikova N.P., Kim N.M., Rotova G.M. Fiziko-khimicheskie svoystva guminovykh veshchestv torfa i burogo uglya [Physicochemical properties of the humic substances of peat and brown coal] // *Khimiya tverdogo topliva – Solid Fuel Chemistry*. 2011; 1: 3–8 (in Russian).
 26. Yudina N.V., Tikhova V.I. Strukturnye osobennosti guminovykh kislot torfov, vydelennykh raznymi sposobami [Structural features of peat humic acids isolated in many ways] // *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya - Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2003; 1: 93–96 (in Russian).
 27. Ellerbrock R.H., Höhn A., Gerke H.H. Characterization of soil organic matter from a sandy soil in relation to management practice using FT-IR spectroscopy // *Plant and Soil*. 1999; 213: 55–61.
 28. Gondar D. [et al.] Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog // *Geoderma*. 2005; 126(3–4): 367–374.
 29. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles // *Peat and Mires*. 2009; 4: 175–197.
 30. Li L. [et al.] Characterization of humic acids by ultrafiltration // *Organic Geochemistry*. 2004; 35: 1025–1037.
 31. Fernandes A. [et al.] Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances // *Journal of Molecular Structure*. 2010; 971 (1): 33–38. DOI: 10.1016/j.molstruc.2010.02.069
 32. Trofimova E.S. [et al.] Vliyanie guminovykh kislot torfa razlichnogo geneza na produktsiyu oksida azota in vitro (skringovoe issledovanie) [Influence of peat humic acids

of various origins in the production of nitric oxide in vitro (screening test)] // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*. 2016; 5: 629–636 (in Russian).

33. Schepetkin I.A., Quinn M.T Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential // *International Immunopharmacol.* 2006; 6 (3): 317–333.

Received November 22.2016

Accepted December 19.2016

Zykova Marija V., PhD, Associate Professor, Department of Chemistry, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Trofimova Evgenija S., PhD, Senior Researcher, Department of Immunopharmacology, GRIPRM, TNIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Krivoshhekov Sergej V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk; Postgraduate Student, Department of Technology of Organic Substances and Polymer materials, NR TPU, Russian Federation.

Ligachjova Anastasija A., PhD, Researcher, Department of Immunopharmacology, GRIPRM, TNIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Danilec Marina G., DBSc, Senior Researcher, Department of Experimental Biological Models of Immunopharmacology, GRIPRM, TNIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Logvinova Ljudmila A., Postgraduate Student, Department of Pharmaceutical Analysis, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Zholobova Galina A., PhD, Associate Professor, Department of Chemistry, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Prishhepova Ol'ga F., Senior Lecturer, Department of Chemistry, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Jusubov Mehman S., DChS, Professor, Principal Researcher of the Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Belousov Mihail V., DPhs, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Zykova Marija V.**, e-mail: gmv2@rambler.ru